

核内オーファンプロテインネットワークの解明

●田代 聡¹⁾ ◆五十嵐 和彦²⁾

広島大学大学院医歯薬学総合研究科医化学

(現1) 広島大学原爆放射線医科学研究所細胞再生学研究分野、2) 東北大学大学院医学系研究科生物化学分野)

〈研究の目的と進め方〉

ゲノムプロジェクトは、数多くの機能未知の蛋白質(オーファンプロテイン)の存在を明らかにしつつある。ゲノム機能を理解する上では、このようなオーファンプロテインを細胞内外における生体反応・制御系の中で位置づけることが必要になる。一方、核では複製、修復、転写などの素反応が特定の部位、すなわち特定の核高次構造と密接な関係があることが近年明らかとなってきている。特に核蛋白質の多くは蛋白質複合体を形成し、核内で特異な分布を示すことが知られている。しかし、このような蛋白質複合体と核高次構造の関連は未だ不明な点が多い。オーファンプロテインの機能を解明する上では、核高次構造に基づいたタンパク質の機能予測が非常に有効な手法となりえる。

そこで本研究では、まず核内で特徴的な分布を示すオーファンプロテインに着目し、その分布と核内反応部位との関連、そして結合因子を同定することにより、核における新しい蛋白質ネットワークを同定することを目指した。ついで、染色体DNAと核蛋白質により構成される基本的な核高次構造を明らかとし、その上で核機能、特に遺伝子転写制御機構と核高次構造の関連の検討を行なった。さらに、特定の核高次構造における転写調節やゲノム修復と細胞分化、細胞死など細胞の運命との関連を最新の画像解析技術を用いた解明をめざした。

〈研究開始時の研究計画〉

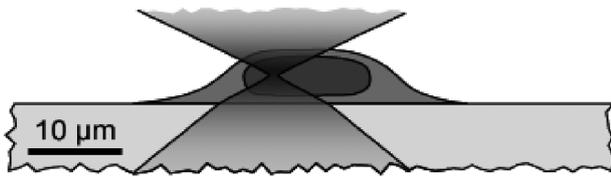
- 1) 核内の機能部位とオーファンプロテインの相互関係を明らかにするために、修復部位、DNA複製部位、およびRNA合成部位を可視化するシステムを構築する。
- 2) ゲノムプロジェクトの成果から、BTB/POZドメインは高等生物で遺伝子数が増大したモチーフであることが報告された。すなわち、酵母ではこのモチーフは1個の遺伝子でのみ機能するが、ヒトでは少なくとも140個の遺伝子が存在する。その多くは転写因子と予想されており、このモチーフの機能を理解することは重要と考えられる。このモチーフは核内でドット状の分布を指令することが明らかになっている。そこで、いくつかのBTB/POZ因子に関してEGFP融合蛋白質を発現させ、そのドットと機能部位の関連を検討する。
- 3) 核機能可視化による核高次構造の解析
核酸標識法を用いて可視化された転写、複製などの核機能の「場」と機能的タンパク質複合体が形成される「場」としてのクロマチン間領域(Interchromatin compartment)の局在解析を行うことにより、核高次構造と複製、転写の関連を検討とする。
- 4) ゲノム修復と核高次構造の関連の解析
などを用いゲノム修復の「場」を可視化するために、紫外線マイクロ照射法を確立し、ゲノム修復関連タンパク質の局在、動態との関連を解析することにより、ゲノム修復機構と核高次構造の関連を検討する。
- 5) 遺伝子転写制御因子の動態と遺伝子転写の「場」の関連の解析

研究分担者により見いだされた遺伝子転写制御因子は、核内で特異な分布を示すことが明らかとなっている。これらの遺伝子転写制御因子の動態と遺伝子転写の関連を蛍光抗体法および生細胞を用いた蛋白質動態解析により検討する。

- 6) 三次元マルチカラー-FISH法を用いた特定の染色体DNAの局在解析を確立する。

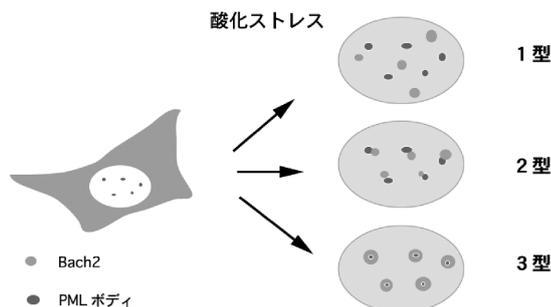
〈研究期間の成果〉

- 1) ゲノム修復部位をRad51抗体染色、DNA複製部位をCy3-dUTPパルス標識、RNA合成部位をBrUTPパルス標識で同時に検出するシステムを構築した。このシステムをオーファンプロテイン-EGFP融合因子発現細胞に用いることにより、核内素反応とオーファンプロテインの局在との関連を検討できるものと期待できる。
- 2) BTB/POZ因子のうち一つに関しては、EGFPとの融合蛋白質が転写部位と一致する核内でのドット状の分布を示すことが明らかになった。
- 3) GFP-RAD51融合タンパク質の過剰発現によりクロマチン間領域の一部を可視化することが可能となった。GFP-RAD51は、核内でフィラメント状の構造体を形成した。このフィラメント状の構造体と遺伝子転写部位、複製部位の局在の関連についてそれぞれの可視化技術を用いて解析を行った。その結果、転写部位はクロマチン間領域と密接な関連があることが明らかとなった。さらに転写部位、複製部位の核内分布には一定の法則があることが示唆された。
- 4) 従来は、マイクロダイセクション用のレーザーを用いた紫外線マイクロ照射法を用いていたが、今回、新しく市販の共焦点レーザー顕微鏡に附属した紫外線レーザー発生装置を用いた紫外線マイクロ照射法を確立し報告した。紫外線マイクロ照射法および通常のX線照射によるゲノム損傷誘導後のゲノム修復関連タンパク質の動態を間接免疫蛍光抗体法を用いて検討した。DNA二本鎖切断の修復に重要なRad51およびMre11の可視化とともに修復のために形成された一本鎖DNAの検出を同時に行った。その結果、ゲノム損傷部位ではまずMre11についてRad51の集積が認められることを明らかにした。また、これらのタンパク質複合体は様々なパターンで一本鎖DNA形成部位と共局在を示し、ゲノム修復の多様性が示唆された。また、紫外線マイクロ照射法により集積したRAD51の局在は、照射12時間後にも大きな動きは示さなかったため、ゲノム修復には大規模なクロマチンの移動は必要とされないと考えられた。この研究結果の一部は、303261345で報告した。



図；紫外線マイクロ照射法により、核の一部に DNA 二本鎖切断を導入することが可能となった。

5) 研究分担者が見出したBach2は、CNCファミリーに属する転写抑制因子であり、B細胞特異的に発現される。Bach2は通常細胞質に局在するが、酸化ストレスにより核内に移行する。核内に移行したBach2は、1) 非クロマチン核内ドメインPML bodyを取り囲むような核内フォーカス、PML bodyに隣接した核内フォーカス、もしくはPML bodyとは独立した核内フォーカスを形成する。酸化ストレス誘導後には、Bach2は主にPML bodyを取り囲むように核内フォーカスを形成し、一部がPML bodyに隣接して核内フォーカスを形成した。このBach2のフォーカス形成には、Bach2のBTB領域を含むN末端領域が重要であった。また、Bach2はSUMO修飾を受けることを明らかにした。Bach2非SUMO化変異体は、PML bodyに隣接した核内フォーカスを形成するがPML bodyを取り囲むフォーカスの数は非常に少なく、このためBach2のSUMO化はBach2がPML bodyを取り囲むように集積するために重要であることが明らかになった。ついで、転写部位とPML body、Bach2フォーカスの局在の関連をBrUTPを用いた転写部位の可視化と間接蛍光抗体法によるBach2、PMLの検出を組み合わせて行った。その結果、通常の状態では、PML body周辺は高い転写活性が認められた。PML body周辺の遺伝子転写活性は、酸化ストレスによりPML body周辺に移行したBach2により特異的に抑制することを明らかにした。以上の結果から、核高次構造に関連する遺伝子の発現調節機構が存在する可能性が示唆された。これらの研究成果の一部は論文(211201123)として研究期間内に発表し、研究期間終了後もさらに研究を進め2004年に論文として最終的な報告を行った。



図；酸化ストレスにより活性化された Bach2 が形成する Bach2 核内フォーカス

1 型；PML body と独立している。2 型；PML body に隣接する。
3 型；PML body を取り囲む。

6) 間期核における染色体領域配置を解析するための三次元マルチカラー-FISH法を確立した。これに関連して、ヒト細胞において染色体の複製標識法を用いることにより、個々の染色体領域が細胞分裂時に再配置されることを海外共同研究者とともに明らかにしたので報告

した。(303261358)

〈国内外での成果の位置づけ〉

ポストゲノム研究の一つとして進められている染色体DNAや蛋白質の核内局在および動態の研究の中でも、遺伝子発現調節と核高次構造の関連については多くの研究者が注目している。従来、ヘテロクロマチンやユウクロマチンなど染色体DNAの高次構造と転写調節との関連の解析が主に行われてきたが、本研究では、非クロマチン核内ドメインと転写調節の関連についての研究を進めることが出来た。その結果、酸化ストレス誘導により活性化された転写因子Bach2がPML body周辺という特定の核高次構造に関連した転写調節に係わっていることを明らかにすることができた。この研究は、非クロマチン核内ドメインと転写調節の関連を示す研究として注目されている。

また、我々が開発した紫外線マイクロ照射法を用いたゲノム修復機構の研究は、ゲノム修復機構の解明における新しい手法として、核高次構造研究のみならず、放射線生物学、がん研究の分野でも注目されている。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

基本的には研究は順調に進んだが、共用の共焦点レーザー顕微鏡を現在使用しているため顕微鏡の使用可能時間が研究の律速段階となる場合があった。核内蛋白質の局在、動態制御に係わると考えられるクロマチン間領域の解析については、転写、複製、修復などの関連はある程度明らかにすることができたが、その構成成分の生化学的解析は不溶性画分の蛋白質解析となるため非常に困難であり、今後の重要な研究課題となっている。

GFP融合蛋白質を用いた蛋白質動態の解析については、GFP融合蛋白質の過剰発現によるアーチファクトの影響もあり、残念ながら本研究期間内には十分なデータを得ることができなかった。

〈今後の課題〉

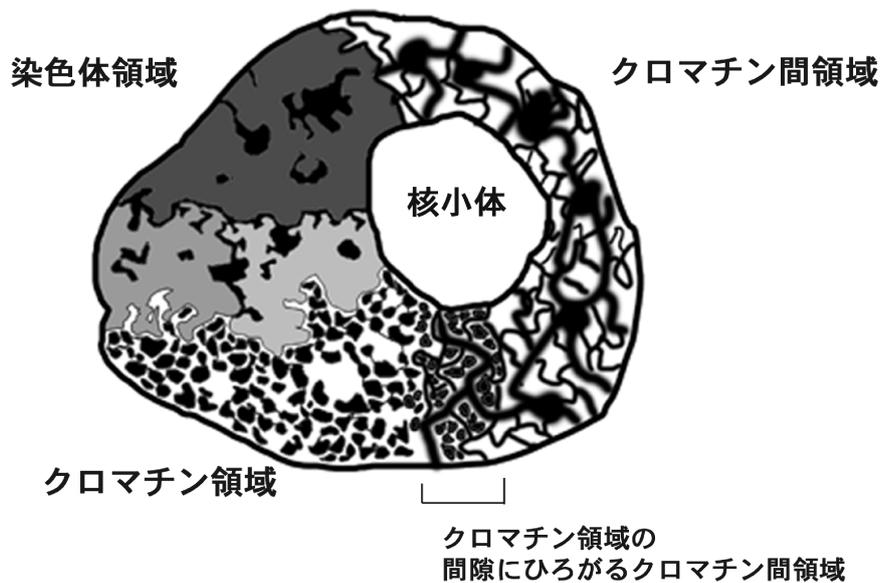
今後は、cDNAライブラリーを用いてPML bodyや核小体などの特定の核高次構造に関連して核内ドメインを形成する蛋白質をスクリーニングする手法を確立し、網羅的に類似の局在を示す核内ドメインを形成するオーファンプロテインを同定し、その機能解析を進める予定である。

本研究では、ゲノム複製、転写、修復などの核機能を可視化する技術を確認することができた。次の段階としては、蛋白質相互作用や蛋白質修飾を可視化する技術を開発することにより、蛋白質複合体が集積している非クロマチン核内ドメインが転写や修復の制御にどのように関わっているかを明らかにしていきたい。また、非クロマチン核内ドメインが形成されるメカニズムを明らかにするために、クロマチン間領域の生化学的解析も引き続き取り組む予定である。このような研究を通して、核高次構造が核機能を制御するうえで果たしている役割を明らかにしていきたい。

PML body周辺では核高次構造依存的な転写調節が行われている可能性が本研究で示唆された。そこで、PML body周辺で転写調節を受けている遺伝子の網羅的解析を行うことで、核高次構造に依存した転写調節を受ける遺伝子群の同定に取り組みたい。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1. Kobayashi, A., Yamagiwa, H., Hoshino, H., Muto, A., Sato, K., Morita, M., Hayashi, N., Yamamoto, M., and Igarashi, K.
A combinatorial code for gene expression generated by transcription factor Bach2 and MAZR (MAZ-related factor) through BTB/POZ domain.
Mol. Cell. Biol. 20, 1733-1746 (2000).
2. Yoshimura, S. H., Yoshida, C., Igarashi, K., and Takeyasu, K.
Atomic force microscopy proposes a 'kiss and pull' mechanism for enhancer function.
J. Electron Microscopy. 49, 407-413 (2000)
3. Miyagawa K., Tsuruga T., Kinomura A., Usui K., Katsura M., Tashiro S., Mishima H. and Tanaka K.
A role for RAD54B in homologous recombination in human cells.
EMBO J. 21, 175-180 (2002)
4. 211201118
Sun J, Hoshino H, Takaku K, Nakajima O, Muto A, Suzuki H, Tashiro S, Takahashi S, Shibahara S, Alam J, Taketo MM, Yamamoto M, Igarashi K.
Hemoprotein Bach1 regulates enhancer availability of heme oxygenase-1 gene. EMBO J. 21(19):5216-5224 (2002)
5. 211201123
Muto A, Tashiro S, Tsuchiya H, Kume A, Kanno M, Ito E, Yamamoto M, Igarashi K.
Activation of Maf/AP-1 repressor Bach2 by oxidative stress promotes apoptosis and its interaction with promyelocytic leukemia nuclear bodies.
6. 303261345
Walter J, Cremer T, Miyagawa K, Tashiro S
A new system for laser-UVA-microirradiation of living cells.
J Microsc. 209:71-75 (2003)
7. 303261358
Walter J, Schermelleh L, Cremer M, Tashiro S, Cremer T.
Chromosome order in HeLa cells changes during mitosis and early G1, but is stably maintained during subsequent interphase stages.
J Cell Biol. 160: 685-697 (2003)



図；クロマチン領域とクロマチン間領域